

# 博士學位論文

内容の要旨  
および  
審査の結果の要旨

薬学研究科

第40号

平成30年5月

徳島文理大学

## は し が き

この冊子は、学位規則（昭和28年4月1日文部省令第9号）第8条による公表を目的として、本学において博士の学位を授与した者の「論文内容の要旨および論文審査の結果の要旨」を収録したものである。

## 目 次

(学位記番号)	(氏 名)	(論 文 題 目)	(頁)
甲第50号	山 崎 直 人	再利用可能な水銀反応剤カルバボラニル水銀塩の創製と抗水カビ活性を有するオリダマイシンAの誘導体合成への応用	1
乙第46号	上田ゆかり	薬物の効率的なデリバリー戦略構築を目指した脳・肺微小血管および胸部大動脈血管内皮細胞の新たな機能の探索と解明に関する研究	7

氏名	やまき なおと 山崎 直人		
本籍	徳島県		
学位の種類	博士（薬学）		
学位記番号	甲第50号（課程博士）		
学位授与年月日	平成30年3月15日		
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当（課程博士）		
学位論文の題目	再利用可能な水銀反応剤カルバボラニル水銀塩の創製と 抗水カビ活性を有するオリダマイシンAの誘導体合成への応用		
指導教員	教授	今川 洋	
論文審査委員	(主査) 教授	吉田 昌裕	
	(副査) 教授	福山 愛保	
	(副査) 教授	角田 鉄人	
	(副査) 外部	難波 康祐 (徳島大学 薬学部)	

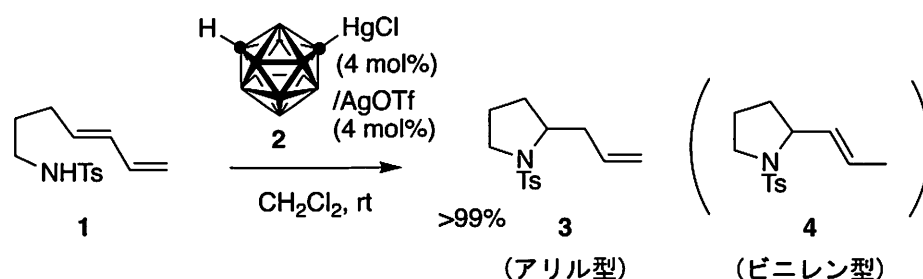
# 論文の内容要旨

山崎 直人

二価水銀塩は有用な化学反応剤である。これまで有機化学の分野においては、高配位性の典型金属塩として、様々な反応開発や合成研究に利用されてきた。しかし、グリーンケミストリーの概念が浸透した現代において、今後、水銀塩反応剤の化学がさらに発展していくためには、必要なものだけをつくりだすための効率と共に、環境負荷を軽減した持続可能な反応系の構築が求められている。このような背景のもと、本研究では、「水銀反応の触媒化、水銀反応剤の回収・再利用する手法の確立、合成研究への応用」をテーマに取り組んできた。そして、二価水銀塩がカルバボラン(中性ホウ素クラスター)の組成炭素と安定な  $\sigma_{C-Hg}$  結合を形成することを見出し、回収可能な新規水銀反応剤カルバボラニル水銀塩 **2** や不均一系触媒 **6** を創製した。さらに、**2** や **6** を用いた新規分子変換反応の開発、生物活性天然物の全合成研究へと展開したので、以下に概要を示す。

まず、1,3-共役ジエン **1** からのアリル型選択的な反応(Scheme 1)の開発に着手した。この過程で、カルバボラニル水銀塩 **2** が高高いLewis酸として機能することを見出し、銀トリフラート[AgOTf]共存下における**1**から**3**への高収率かつ高選択的な環化反応を開発した。本反応条件は、1,3-共役ジエンを基質とした炭素-窒素結合形成反応や炭素-炭素結合形成反応に利用可能で、アリル型選択的な環化反応として精密合成への応用が期待される。

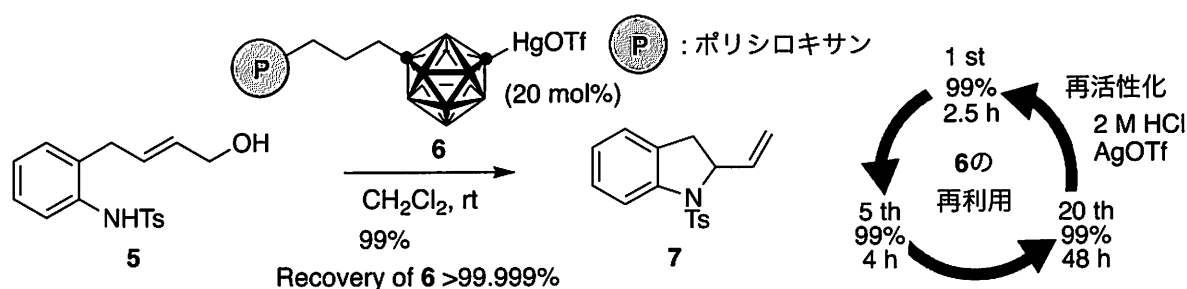
**Scheme 1** カルバボラニル塩化水銀の創製と応用



次に、**2**の物性研究を展開することで、**2**が超強酸トリフルオロメタンスルホン酸に対して他の水銀塩よりも耐酸性に優れていることを見出した。そして、**2**を不溶性ポリ

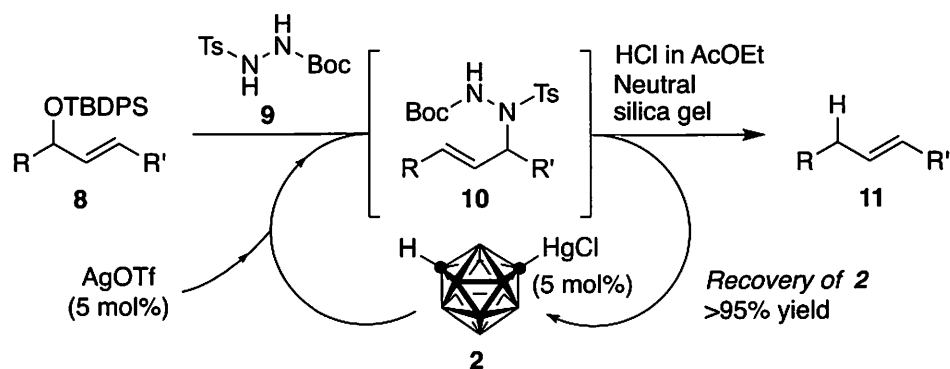
マーのポリシロキサンに担持した不均一系反応剤 **6** を開発した (Scheme 2). **6** は, 検出限界にせまる水銀回収率を示すと共に, 既知の水銀トリフラート系反応 (1,3-共役ジエン環化反応やアリルアルコール環化反応, アルキン環化反応等) の代替試薬として利用できることを見出した. また, **6** が 2 mol/L 塩酸と AgOTf を用いた再活性化によって触媒能を復活できることを見出した.

**Scheme 2** ポリシロキサン架橋型カルバボラニル水銀トリフラートの開発



次に, **2** と AgOTf 触媒を用いてアリルシリルエーテル **8** と *N*-Boc-*N'*-トシルヒドラジド **9** との分子間アリルアミノ化反応を開発した (Scheme 3). そして, 得られたアリルヒドラジン誘導体 **10** を利用して Myers 型の環化的脱窒素化反応に展開し, **8** からのワンポット反応として **11** が生成することを見出した. また, 本研究の過程で, **2** が再回収可能な水銀反応剤であることを突き止めた.

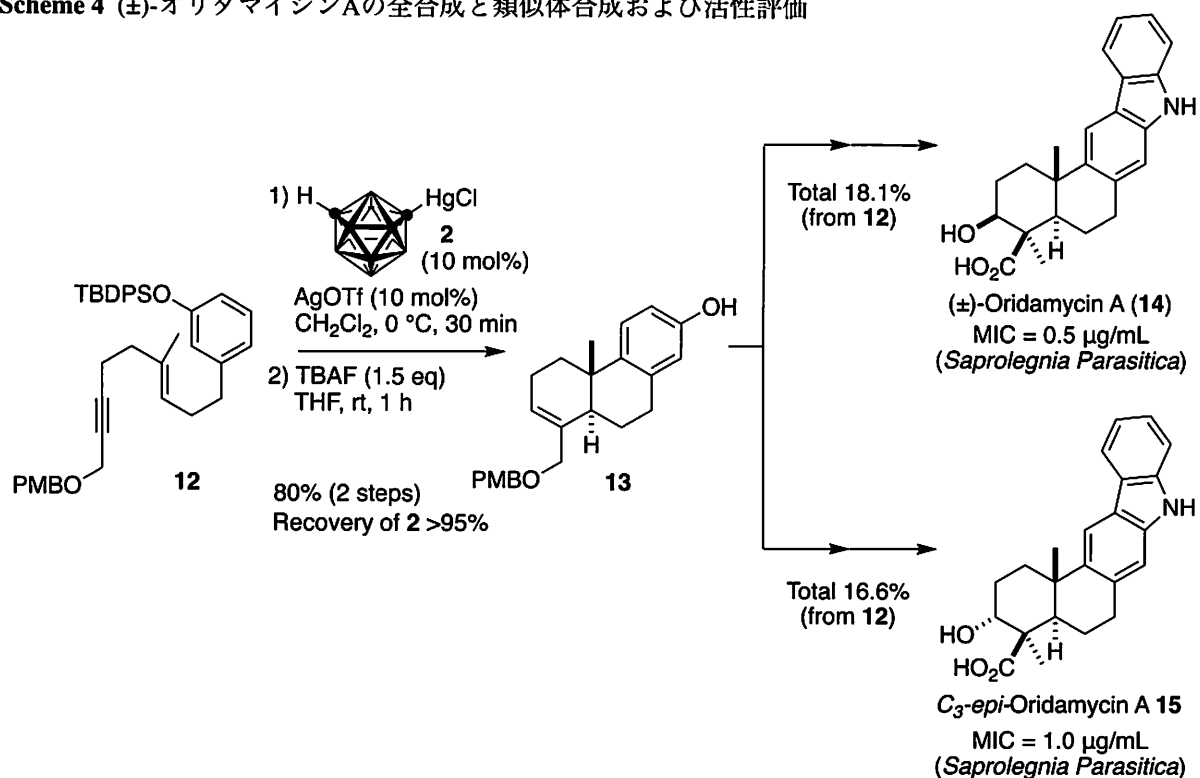
**Scheme 3** Myers型還元的脱窒素化反応の開発



次に, **2** を抗水カビ活性を示すオリダマイシン A (**14**) の全合成に利用した. その成果として, **2** と AgOTf を用いた **12** から **13** への多重環化反応を鍵段階とするオリダマイシン A (**14**) のラセミ全合成を達成することができた (Scheme 4). 確立した本合成ルートは, **13** を鍵中間体として様々な類似体合成が期待できる. 実際に, オリダマイシン

A の C<sub>3</sub>-*epi* 体 **15** を合成し，ラセミオリダマイシン A と **15** を用いて，水カビ病の原因菌: サプロレグニアパラシチカへの抗菌活性を評価した。これらの構造活性相関により，3 位水酸基の立体化学は抗菌活性に影響を及ぼす重要な官能基であることを確認した。

**Scheme 4** (±)-オリダマイシンAの全合成と類似体合成および活性評価



## 論文審査結果の要旨

本論文は、水銀反応剤を用いた触媒反応の開発と共に、水銀化学のグリーンケミストリーを指向した研究について論じている。すなわち、水銀廃液の問題解決に向けて回収可能な新規水銀反応剤：カルバボラニル水銀塩や不均一系反応剤：ポリシロキサンカルバボラニル水銀トリフラートを創製し、それらを利用した反応開発や合成研究へと展開した論文構成になっている。

初めに、筆者は嵩高い水銀反応剤を利用した 1,3-共役ジエンからのアリル型選択的な反応の開発に着手している。検討当初では、嵩高い水銀反応剤のモデルとしてフェニル水銀塩を用いて反応を試みたが、選択的な環化反応が進行しなかったことを確認している。そこで、嵩高い置換基として機能する分子を探索し、カルバボラン(中性ホウ素クラスター分子)の利用を着想している。その後、カルバボランの組成炭素と水銀が安定な  $\sigma_{C-Hg}$  結合を形成することを見出し、カルバボラニル塩化水銀の創製に成功している。そして、本剤が嵩高いルイス酸として機能することを見出し、銀トリフラート共存下における 1,3-共役ジエンを基質としたアリル型選択的な環化反応を開発した。

次に、カルバボラニル塩化水銀の新規不均一系反応剤の開発を前提に、カルバボラニル水銀塩の物性研究を展開した。その成果として、カルバボラニル水銀塩が超強酸トリフルオロメタンスルホン酸に対して他の水銀塩よりも耐酸性に優れていることを見出した。その後、カルバボラニル水銀塩に不溶性ポリマーのポリシロキサンに担持した不均一系反応剤を開発した。そして、本剤がほぼ水銀漏出なく水銀反応剤を回収できることと共に、既知の水銀トリフラート系反応の代替試薬として利用できることを見出した。また、活性が低下した不均一系反応剤に 2 mol/L 塩酸による洗浄と AgOTf を用いた再活性化によって触媒能が復活することを見出した。

次に、前述した不均一系反応剤を用いてアリルシリルエーテルと *N*-Boc-*N'*-トシルヒドラジドとの分子間アリルアミノ化反応の開発に着手している。しかし、不均一系反応剤を用いた反応条件では、中程度の収率に留まったことを確認している。そこで、筆者は、カルバボラニル水銀塩/銀トリフラートを用いた条件で再検討し、良好な収率でアリルアミノ化反応が進行することを確認した。次いで、得られたアリルヒドラジン誘導

体を利用して Myers 型の環化的脱窒素化反応に展開し、アリルシリルエーテルからのワンポット反応としてアルケンが生成することを見出した。また、本研究の過程で、カルバボラニル水銀塩が再回収可能な水銀反応剤であることを見出した。

次に、回収可能なカルバボラニル水銀塩を生物活性天然物の合成研究に利用することを試みている。その成果として、カルバボラニル塩化水銀と銀トリフラートをを用いた多重環化反応を鍵段階とするオリダマイシン A のラセミ全合成を達成した。確立した本合成ルートは、オリダマイシン A の合成中間体から様々な類似体合成が期待できる。実際に、筆者は、オリダマイシン A の C<sub>3</sub>-*epi* 体を合成に成功しており、水カビ病の主な原因菌：サプロレグニアパラシチカへの抗菌活性を評価している。そして、これらの構造活性相関により、3 位水酸基の立体化学が抗菌活性に影響を及ぼす重要な官能基であることを確認している。

以上、本論文は、再利用可能なカルバボラニル水銀塩の創製からオリダマイシン A とその類似体の合成研究まで展開した研究の内容であり、新規反応剤の有用性を検証し、水銀反応剤の使用後に生じる水銀廃液の問題を克服できる可能性を示した重要な知見である。今後、水銀化学のグリーンケミストリーに貢献できることが期待される。よって、本論文は博士（薬学）の学位に値するものと認める。

論文審査委員	主査（教授）	吉田 昌裕
	副査（教授）	福山 愛保
	副査（教授）	角田 鉄人
	副査（外部）	難波 康祐



氏名	うえだ 上田 ゆかり
本籍	徳島県
学位の種類	博士（薬学）
学位記番号	乙第 46 号（論文博士）
学位授与年月日	平成 30 年 3 月 15 日
学位授与の要件	学位規定第 4 条第 2 項該当（論文博士）
学位授与の題目	薬物の効率的なデリバリー戦略構築を目指した 脳・肺微小血管および胸部大動脈血管内皮細胞の 新たな機能の探索と解明に関する研究
指導教員	教授 櫻井栄一
論文審査委員	(主査) 教授 永浜政博 (副査) 教授 京谷庄二郎 (副査) 教授 井上正久 (副査) 教授 石田竜弘 (徳島大学 薬学部)

## 論文の内容要旨

上田ゆかり

ストレス社会そして高齢化社会の到来により、抗うつ薬、認知症の治療薬や抗パーキンソン病薬など神経疾患の治療薬の開発が急務とされている。しかし、脳内への薬物の送達で大きな障害になるのは血液脳関門(BBB)を構成する毛細血管内皮細胞の存在と考える。中枢で薬効を速やかに発揮させるには、いかにしてこのバリアーを突破させ、脳内へ薬物を送達させるかが鍵となる。一方、肺からの薬物送達を考えた場合、そのバリアーとなるのは肺泡を形成するI型上皮細胞と肺泡を取り巻く毛細血管の内皮細胞である。経肺吸収は、ペプチドやタンパク性薬物のように水溶性で高分子である難吸収性物質の投与経路としても注目されているが、多くの水溶性薬物は肺からの吸収が妨げられ、開発の段階でドロップアウトしてしまう。これまでの研究において、薬物の脳内移行や経肺吸収については主にトランスポーターやレセプターを介した、すなわち細胞内経路に関する研究に焦点が絞られていた。しかし、脳内への効率的な薬物のデリバリーや経肺吸収を考えるには毛細血管内皮細胞のトランスポーターの機能だけではなく、新たな機能の探索と解明が必要となる。血液中に運ばれた薬物が組織に移行する際、第一関門となるのが毛細血管内皮細胞である。本学位論文では、血液組織関門を構成する毛細血管内皮細胞の内皮細胞同士がタイトジャンクション(TJ)を形成する場合、TJの形成は組織への物質輸送に対し強固な透過バリアーとなる。また、毛細血管内皮細胞は常に血液に接し好氣的条件に曝されている。そのため組織に移行する前に薬物が好氣的に代謝され効率的な薬物の移行ができない場合、毛細血管内皮細胞は代謝バリアーとして機能することになる。これらバリアーの打破、すなわち透過バリアーであるTJの可逆的な開口および代謝バリアーである内皮細胞内の薬物代謝の回避が薬物の組織への効率的なデ

リバリーに繋がると考え、培養微小血管内皮細胞を用い、薬物の細胞間隙に関する TJ の形成とその開口、さらに薬物の消失に関与する薬物代謝能力の有無を検討した。

第一章では、培養マウス肺微小血管内皮細胞(LMECs)の播種 1 日目から Occludin、Claudin-1、Claudin-4 および ZO-1 の mRNA の発現が確認された。なかでも Claudin-1 の mRNA レベルは培養 6 日目から有意に増加し、7 日目には基準値 (1 日目) の約 7 倍に達し、その後、基準値レベルまで戻った。しかし、Occludin、Claudin-4 および ZO-1 の mRNA レベルは培養 8 日目まで基準値と大きな差はなかった。mRNA の有意な増加が認められた培養 6 日目における TJ タンパク質を観察したところ、Occludin、Claudin-1、-4、および ZO-1 のタンパク質の発現が認められた。培養マウス LMECs は、経日的に経内皮電気抵抗値およびフルオレセインの細胞間隙透過クリアランスの測定から 6-7 日目に TJ の形成が確認された。このことから、Claudin-1 の mRNA 発現が TJ の強固な形成に関与することが考えられた。今後、培養マウス LMECs の TJ の状態を知る上で Claudin-1 の mRNA 発現が有用な手がかりになる可能性が考えられる。

第二章では、トランスウエルに播種した培養マウス LMECs にヒスタミンを添加すると、フルオレセインの細胞間隙透過クリアランスが増加し、しかもヒスタミンが TJ の開口を可逆的に引き起こすことがわかった。今後、細胞膜に存在する H<sub>1</sub> および H<sub>2</sub> 受容体を介したヒスタミンの TJ 開口作用メカニズムについて検討する予定である。一方、培養ラット LMECs に取り込まれた L-ヒスチジンから L-ヒスチジン脱炭酸酵素によりヒスタミンが産生される。細胞内ヒスタミンをリガンドとする核内受容体が存在すると想定した場合、細胞内で産生されるヒスタミンが、TJ の開口に関わることも予想される。本研究では、第一段階として、細胞内への L-ヒスチジン取り込み増加がヒスタミン産生の促進に繋がると

考え、L-ヒスチジンの取り込みを増加させる物質の探索を行った。その結果、生体内必須微量元素である亜鉛添加により L-ヒスチジン単独で観察された Na<sup>+</sup>依存性共輸送型 System-N 系による L-ヒスチジン取り込みは消失し、促進拡散型トランスポーター System-L のみで細胞内へ輸送されることが判明した。亜鉛添加が微小血管内皮細胞内 System-L 輸送系による L-ヒスチジンの取り込みを顕著に増加し、ヒスタミンの産生を増加させる可能性を示唆した。今後、前述した細胞外に存在するヒスタミンとは別に、微小血管内皮細胞内で HDC によって産生されたヒスタミンに作用について今後、特にヒスタミンをリガンドとする核内受容体の解明に着手する予定である。

第三章では、BBB を構成する培養ラット脳微小血管内皮細胞 (BMECs) でのフラビン含有モノオキシゲナーゼ(FMO)活性を検討するために FMO の基質である第三級アミンを持つ *d*-クロルフェニラミンを用いて検討した。培養ラット BMECs は、pH 7.4 および pH 8.4 条件下で *d*-クロルフェニラミンを *N*-酸化した。*d*-クロルフェニラミン *N*-酸化への代謝クリアランス値( $V_{max}/K_m$ )は pH 7.4 条件下に比べ pH 8.4 条件下で約 1.3 倍高い値を示した。FMO の代表的な基質であるメチマゾールの添加は、*d*-クロルフェニラミン *N*-酸化体生成を用量依存的に競合阻害した。また、培養ラット BMECs に発現する FMO 分子種をウエスタンブロット法で確認すると FMO3 と FMO4 は検出限界以下であったが、FMO1、FMO2 および FMO5 発現が確認された。Eadie-Hofstee プロット解析から、*d*-クロルフェニラミン *N*-酸化体の生成は pH 7.4 および pH 8.4 条件下で一相性を示し、FMO1、FMO2 および FMO5 のうち、1 つの分子種が *d*-クロルフェニラミン *N*-酸化体の生成に関与すると考えられる。培養ラット BMECs とラット肝細胞の FMO 発現を比較し、*d*-クロルフェニラミンが肝臓で FMO1 により代謝されることから、培養ラット BMECs での *N*-酸化体生成は FMO1 によって触媒されると考えられ

る。培養ラット BMECs の *d*-クロルフェニラミン *N*-酸化体生成は、ラット肝細胞における *N*-酸化体生成の約 1/2 を示した。しかし、脳毛細血管内皮細胞数の存在を考えると肝細胞と同程度の FMO 活性を有していると推察される。これらの結果は、BBB を構成する培養ラット BMECs は FMO を有する重要な薬物の代謝バリアーになることがわかった。

第四章では、培養ラット胸部大動脈血管内皮細胞 (TAECs) が三環系抗うつ薬で、第三級アミンであるイミプラミンを代謝する能力を有するかを検討した。培養ラット TAECs は、イミプラミンをシトクロム P450s(CYPs)および FMO によりそれぞれイミプラミン *N*-脱メチル化体および *N*-酸化体を生成した。イミプラミン *N*-酸化体反応の代謝クリアランス値 ( $V_{\max}/K_m$ ) は、*N*-脱メチル化体反応の約 5 倍であり、FMO による反応が CYP による反応よりも速い速度で進行することが認められた。さらに、培養ラット TAECs における *N*-脱メチル化反応は、抗 CYP2C11 血清および抗 CYP3A2 血清を用いた代謝反応により CYP2C11 および CYP3A2 が関与することが明らかになった。CYP2C11 および CYP3A2 タンパク質は、ポリクローナル抗 CYP 抗体を用いた免疫蛍光染色法により培養ラット TAECs に発現していることが明らかになった。一方、イミプラミン *N*-酸化反応は、pH 7.4 条件下と比較して pH 8.4 条件下において約 1.4 倍高い活性を示した。FMO の基質であるメチマゾールにより *N*-酸化反応の阻害効果が認められ、阻害様式は競合的であった。イミプラミン *N*-酸化は培養ラット TAECs において主に FMO により代謝されると考えられる。これらの結果は、培養ラット TAECs が肝細胞の他に薬物の代謝能力を有する重要な機能を持つことが示唆された。

以上、タイトジャンクションの開口と微小血管内皮細胞内薬物代謝の回避が組織への薬物の効率的なデリバリー戦略構築の鍵となり、新薬の開発およびこれまでドロップアウトした薬物の新薬開発への再評価に繋がるものと考えられる。

## 論文審査結果の要旨

本論文は、微小血管内皮細胞による新たな機能の探索と解明により薬物の組織への効率的なデリバリーの糸口を見つけることを目的として行われた研究について論じている。すなわち、微小血管内皮細胞のタイトジャンクション(TJ)の形成と開口、さらに微小血管内皮細胞および胸部大動脈血管内皮細胞の薬物代謝能力の解析を行い、薬物の組織移行性に対する新規な知見を含めた論文構成になっている。

まず初めに、薬物の経肺吸収の障害となっている肺微小血管内皮細胞(LMECs)の TJ 形成について検討を行っている。TJ タンパク質である Occludin、Claudin-1、Claudin-4 および ZO-1 の発現とそれら mRNA の発現が認められた。そして、LMECs の TJ の経内皮電気抵抗およびフルオレセインの細胞間隙透過クリアランスから TJ 形成が確認され、その強固な形成に Claudin-1 の mRNA 発現が関与することを明らかにした。今後、LMECs の TJ 形成に Claudin-1 遺伝子発現が指標として期待される。

次に、著者は、TJ 形成が確認された LMECs の TJ 開口に着目し、ヒスタミンによる TJ 開口について検討を行っている。ヒスタミン添加後 5 分から約 1 時間の間に TJ のフルオレセインの細胞間隙透過クリアランスが有意に上昇したが、3 時間後にはオリジナルレベルに戻り、TJ の開口は可逆的な反応であることを見出した。さらに、細胞内ヒスタミンにも着目し、L-ヒスチジンの取り込みを増加させると L-ヒスチジン脱炭酸酵素により細胞内ヒスタミンが増加すると考え、L-ヒスチジンの取り込みを増加させる物質の検討を行っている。その結果、L-ヒスチジンは亜鉛により取り込みを増加させることを見出した。生体内必須微量元素である亜鉛添加により、L-ヒスチジン単独で観察された Na<sup>+</sup>依存性共輸送型 System-N 系による L-ヒスチジンの取り込みは消失し、促進拡散型トランスポーター System-L 系のみで細胞内へ L-ヒスチジンの取り込みを顕著に増加することが明らかとなった。

続いて、著者は血液脳関門を構成する脳微小血管内皮細胞(BMECs)を用いて第三級アミンである *d*-クロルフェニラミンに対する代謝能力について検討を行っている。BMECs にはフラビン含有モノオキシゲナーゼ(FMO)1、FMO2 および FMO5 が発現しており、*d*-クロルフェニラミン *N*-酸化反応は BMECs に発現して

いる FMO 分子種のうち、1 つの分子種が関与していることを明らかにした。BMECs は肝細胞に匹敵する FMO 活性を有し、薬物の代謝バリアーになっていることを初めて見出している。

さらに、毛細血管内皮細胞だけではなく大循環系を構成する胸部大動脈血管内皮細胞(TAECs)に三環系抗うつ薬で第三級アミンであるイミプラミンを代謝する能力があるか否かの検討を行っている。イミプラミン *N*-酸化反応および *N*-脱メチル化反応には FMO およびシトクロム P450(CYP)の 2C11 および 3A2 が関与し、TAECs において FMO の活性が CYP の活性より優位なことを見出した。毛細血管内皮細胞と併せて胸部大動脈血管内皮細胞も薬物の代謝能力をもつことから血管内皮細胞内での薬物代謝の回避が薬物の組織への効率的なデリバリーの鍵になることを示唆している。

以上、これらの研究結果は、薬物の新薬開発やこれまでドロップアウトした薬物の新薬開発の再評価に繋がり、本論文に記述された血管内皮細胞の新たな機能の探索と解明は、薬物の組織への効率的なデリバリー戦略に欠かせない重要な意義をもつ。これらの結論を導くためのデータは質、量とも十分であり、今後の薬剤学の研究分野において大いに貢献できると考えられる。よって、本論文は博士（薬学）の学位に値するものと認める。

論文審査委員	主査（教授）	永浜 政博	印
	副査（教授）	京谷 庄二郎	印
	副査（教授）	井上 正久	印
	副査（教授）	石田 竜弘	印

(徳島大学 薬学部)